

**Contribution à l'étude
des milieux de coletsos
pour la culture
du bacille tuberculeux
et des mycobactéries atypiques**

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
DES LABORATOIRES DE L'HÔPITAL JULES-COURMONT
DE L'HÔPITAL SAINTE-EUGÉNIE ET DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 20 Décembre 1963

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Jean SARROUY

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 30 Avril 1939, à ALEP (Syrie)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1963

**Contribution à l'étude
des milieux de coletsos
pour la culture
du bacille tuberculeux
et des mycobactéries atypiques**

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
DES LABORATOIRES DE L'HÔPITAL JULES-COURMONT
DE L'HÔPITAL SAINTE-EUGÉNIE ET DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 20 Décembre 1963

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Jean SARROUY

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 30 Avril 1939, à ALEP (Syrie)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1963

UNIV.
BIBLIOTHEQUE
24 1929

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires M. J. LEPINE, Membre de l'Institut.
 Doyen M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut
 Assesseurs M. J.-F. CIER.
 MM. M. LEVRAT et L. REVOL.

Professeurs Honoraires : MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
 MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET,
 HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

Clinique urologique MM.	CIBERT.	Clinique traumatologique	
Physique biologique	PONTHUS	des membres MM.	CREYSSSEL.
	(dét. à Bey-	Clinique carcinologique ..	DARGENT.
	routh).	Anatomie pathologique ..	GUICHARD.
		Pathologie générale et ex-	
	DECHAUME.	périmentale	GIRARD Paul.
Clinique neuro-psychiatri-		Anatomie	LATARJET.
que et hygiène mentale		Pathologie chirurgicale ..	PEYCELON.
Chimie organique et toxi-	CHAMBON.	Thérapeutique	GIRARD
cologie	WERTHEIMER.		Marcel.
Clinique chirurgicale B ..	PAUPERT-		VACHON.
Clinique médicale B	RAVAULT.	Pathologie médicale	
		Physio-pathologie des voies	
Clinique et prophylaxie	FROMENT.	respiratoires	GALY.
cardio-vasculaires	CROIZAT.	Radiologie	PAPILLON.
Clinique médicale C		Clinique des maladies in-	
Chimie biologique et médi-	ENSELME.	fectieuses	JEUNE.
cale	MALLET-GUY.	Hydrologie thérapeutique,	
Clinique chirurgicale A ..	REVOL.	climatologie et écologie	
Pharmacie galénique	POLLOSSON.	sociale	GONIN.
Clinique gynécologique ..	PIGEAUD.	Bactériologie	MONNET.
Clinique obstétricale	BOURRET.	Physiologie et pathologie	
Médecine du travail	LEVRAT.	obstétricales	BANSSILLON.
Clinique médicale A		Physiologie B	CHATONNET.
Hygiène et action sanitaire	SOHIER.	Clinique endocrinologique.	GUINET.
et sociale	NETIEN.	Clinique de chirurgie or-	
Botanique et cryptogamie.	BERTRAND.	thopédique	TRILLAT.
Clinique chirurgicale C ..		Clinique stomatologique ..	FREIDEL.
Chimie analytique phar-	BADINAND.	Clinique de chirurgie et	
maceutique		d'orthopédie infantiles .	MARION
Pharmacie chimique et	DREVON.		Joseph.
pharmacologie		Matière médicale et légis-	
Médecine légale et déonto-	ROCHE.	lation pharmaceutique ..	DORCHE.
logie		Histologie et embryologie.	DUMONT Louis.
Parasitologie et pathologie	COUDERT.	Chimie	PERROT.
exotique		Physiologie A	CIER J.-F.
Clinique d'oto-rhino-laryn-	MOUNIER-	Thérapeutique chirurgicale	
gologie et d'audio-pho-	KUHN.	et chirurgie opératoire.	PERRIN J.
nologie	PAUFIQUE.	Clinique de chirurgie car-	
Clinique ophtalmologique ..		diacque	MICHAUD
Clinique de dermatologie,		Clinique médicale infantile	Pierre.
syphiligraphie et aller-	THIERS.	et hygiène du premier	
gologie		âge	X...
Clinique de pneumo-phti-	BRUN.	Biologie médicale et phar-	
siologie		macodynamie	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM.	BERGER.
Bactériologie		BERTOYE.
Neuro-chirurgie		MANSUY.
Chimie pharmaceutique		COLLET.
Clinique de pédiatrie		SARROUY.
Climatologie		LACROIX.
Clinique chirurgicale propédeutique		LIARAS.
Neuro-chirurgie		LECUIRE.
Médecine générale		REVOL.
Thérapeutique chirurgicale		GOINARD.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN.
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André.
Anatomie pathologique	FEROLDI.
Physique biologique	MORET.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSSSEL Roger	Pathologie expérimentale	MM. JOUVET.
Hygiène	THIVOLET.	Médecine générale et thé-	
Parasitologie	GARIN.	rapeutique	LEJEUNE.
Electro-radiologie	PINET.	Stomatologie	de MOURGUES
Botanique et cryptogamie	ODDOUX.		F.
Chimie analytique	de SOLLIERS.	Maladies infectieuses	NAUSSAC.
Médecine du travail	TOLOT.	Chirurgie générale	REBOUILLAT.
Médecine générale	DESPIERRES.	Pédiatrie	ROMAGNY.
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT.	Médecine générale	DELAHAYE J.P.
Chirurgie générale	DESCOTES.	Anesthésiologie	DELEUZE R.
Physique biologique	PEYRIN.	Electroradiologie diagnostic	
Anatomie pathologique	TOMMASI.	et thérapeutique	GIRAUD M.
Electro-radiologie	BUFFARD.	Anesthésiologie	MICHEL.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Anatomie	MM. DUROUX.	Chimie analytique	MM. MALLEIN.
Thérapeutique	BRETTE.	Hygiène	RIFFAT.
Anatomie	BOUCHET.	Biologie médicale et phar-	
Hématologie	FAVRE-GILLY.	macodynamie	FAUCON.
Histologie et embryologie	GIROD.	Physiologie	FLANDROIS.
Chimie biologique	GRAS.	Bactériologie	VIALIER-
			RAYNARD.

AGREGES EN EXERCICE

Obstétrique	MM. BURTHIAULT.	Chirurgie générale	MM. SAUBIER.
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS.	Neuro-psychiatrie	SCHOTT.
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX.	Neuro-chirurgie	ALLEGRE.
Chirurgie générale	GUILLEMIN.	Electro-radiologie	CHASSARD.
Chirurgie générale	JAUBERT-	Orthopédie	FAYSSE.
	DE-BEAUJEU.	Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD.
Chirurgie générale	MARION Pierre.	Médecine générale	GARDE.
Médecine générale	PLAUCHU.	Ophtalmologie	HUGONNIER.
Médecine générale	PONT.	Pneumo-phtisiologie	KALB.
Chirurgie générale	SAUTOT.	Médecine générale	LARBRE.
Médecine générale	TRAEGER.	Chirurgie générale	MARET.
Médecine générale	VIGNON.	Médecine générale	MORNEX.
Ophtalmologie	BONAMOUR.	Médecine générale	NORMAND.
Médecine légale	COLIN.	Médecine générale	PERRIN André.
Dermatologie	COLOMB.	Pédiatrie et puériculture	BETHENOD.
Chirurgie générale	de MOURGUES	Stomatologie	DUMAS.
	Georges.	Médecine générale	FRIES.
Médecine générale	DEVIC.	Obstétrique	GARMIER.
Obstétrique	DUMONT	Médecine générale	LAMBERT.
	Martial.	Chirurgie générale	MICHOULIER.
Urologie	DURAND.	Médecine générale	NOEL.
Chirurgie générale	FRANCILLON.	Médecine générale	ROBERT.
		Orthopédie	SCHNEPP.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : P. GIRARD ; *Assesseurs* : MM. P. MONNET,
A. BERTOYE et J. VIALIER-RAYNARD.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL GIRARD

Professeur de Pathologie générale et expérimentale

Il nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'hommage
de notre profond respect.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MONNET

Professeur de Bactériologie

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BERTOYE

Professeur de Bactériologie

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. VIALLIER-RAYNARD

Maître de Conférences Agrégé

Il a bien voulu nous confier le sujet de cette thèse et nous a guidé à chaque instant dans l'élaboration de ce travail en nous accueillant toujours avec la plus grande bienveillance.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude et de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-LIEUTENANT-COLONEL J. GIRARD

Médecin et Spécialiste des Hôpitaux Militaires

*Ancien Chef de Service de Dermatologie
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

Nous le remercions des conseils qu'il nous a prodigués au cours du stage interné que nous avons effectué dans son service.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-LIEUTENANT-COLONEL P. MAITRE

Spécialiste des Hôpitaux Militaires

*Chef du Laboratoire de Bactériologie et du Service
des Contagieux de l'Hôpital Militaire Desgenettes*

Il nous a fait profiter pendant les quelques mois que nous avons passés dans son service de ses connaissances d'homme de Science et de Clinicien.

Il nous a cordialement ouvert les portes de son laboratoire. Qu'il en soit ici remercié.

AUX MÉDECINS-CAPITAINES FAVIER, PAYEN

Assistants des Hôpitaux Militaires

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON
DES HOPITAUX CIVILS
ET DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION
DESGENETTES

A MONSIEUR LE MÉDECIN-GÉNÉRAL R. BORON

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

*Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL A. CAMELIN

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

*Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MESDEMOISELLES J. AUGAGNEUR ET R. LANERYE

Techniciennes

Qui ont réalisé la partie expérimentale de ce travail.

INTRODUCTION

La pratique systématique d'ensemencements de produits pathologiques contenant des bacilles de Koch visibles à l'examen direct a montré que dans certains cas ces bacilles ne poussaient pas sur les milieux qui leur étaient proposés.

D'autre part, le même fait était constaté, encore plus fréquemment, pour des prélèvements provenant de pièces d'exérèse pour tuberculose pulmonaire et renfermant des bacilles visibles.

Dans ces deux cas, le problème se posait de savoir si ces corps bacillaires visibles à l'examen direct ne représentaient que des cadavres dégénérés ou bien s'il s'agissait de bacilles vivants mais requérant des conditions de cultures répondant mieux à leurs exigences.

Il nous semble qu'on doit classer différemment selon les deux provenances que nous avons indiquées (crachats et pièces d'exérèse) ces bacilles visibles à l'examen direct qui ne donnent pas de culture ni ne tuberculisent le cobaye. Il est probable que les bacilles éliminés dans l'expectoration correspondent à un foyer tuberculeux actif et sont des bacilles vivants alors que les bacilles emmurés dans un prélèvement de pièces d'exérèse et qui ne poussent pas sont sans doute des bacilles morts. Nous voudrions donner le qualificatif de « non cultivables » aux premiers de ces bacilles pour réserver celui de « non viables » aux seconds.

Nous limiterons notre étude aux bacilles de l'expectoration et notre propos sera de contribuer à savoir si certaines techniques de culture permettent de réduire le nombre de ces germes « non cultivables » pour déterminer quels sont les véritables germes dits « visibles et non viables ».

De plus, pour compléter l'étude de ces techniques de culture, nous donnerons les résultats de leur application à la recherche de quelques mycobactéries non tuberculeuses.

CHAPITRE PREMIER

METHODES ET MILIEUX PROPOSES POUR L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX A PARTIR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

La première culture du bacille tuberculeux fut réalisée par Robert Koch, en 1884. Ilensemence un broyat de tubercules ramollis sur un milieu constitué par du sérum coagulé de bœuf ou de mouton. Mais ce milieu ne convenait qu'à la culture d'un inoculum très riche comme l'extrait de tubercules ramollis et non à la recherche de bacilles tuberculeux dans un produit pathologique tel que les crachats. La réussite de la culture sur ce milieu pauvre était due, semble-t-il, au phénomène de l'autostimulation qui se produit quand un grand nombre de bacilles sontensemencés en même temps. Tout se passe comme si l'ensemencement apportait quelques facteurs nécessaires ou même indispensables aux toutes premières divisions cellulaires.

C'est quelques années plus tard que deux éléments indispensables à la culture des mycobactéries sont individualisés. En premier lieu, la glycérine jugée d'abord indispensable, puis nécessaire, puis simplement utile, puis enfin souvent nocive. Le jaune d'œuf ou le contenu de l'œuf de poule est le second élément constitutif des milieux favorables, rôle qu'il gardera jusqu'à l'invention des milieux albumineux synthétiques.

C'est ainsi que le premier milieu favorable à l'isolement du bacille de Koch même à partir de produits pathologiques tels que les crachats, est découvert par Nocard et Roux en 1887 : la glycérine, ajoutée en proportion convenable aux milieux ordinaires comme le bouillon, la gélose et le sérum, impropres à la culture du bacille de Koch, les transforme en milieux favorables.

Un an plus tard, Pawlowski mettait au point la culture du bacille de Koch sur pomme de terre glycinée.

Les milieux de Sauton, Calmette, Massol et Breton sont aussi des milieux utilisant la glycérine.

Le premier milieu à l'œuf de poule fut employé par Capaldi en 1896. L'usage de cette méthode n'est passé dans la pratique courante qu'avec Dorset qui utilise l'œuf dilué dans une solution de sérum physiologique à 10 %. Puis, Lubenau améliore la technique en ajoutant par œuf 30 % de son poids de macération de bouillon de viande glyceriné à 5 %.

En 1928, Petraghani introduit un nouveau milieu à l'œuf avec de la peptone et du vert malachite.

C'est en 1931, que Lœwenstein divulgue la composition de son premier milieu à l'œuf contenant de l'asparagine, du rouge Congo ou du vert malachite. Les milieux de Lœwenstein et leur utilisation ont été bien étudiés dans les thèses de Lemoine (52), Bouquin (11) et Fabre (29).

Un nouveau milieu synthétique fut introduit par Youmans. Puis, en 1946, apparut un autre milieu synthétique, celui de Dubos contenant du tween 80 (27).

Enfin, Jensen améliora le milieu de Lœwenstein en abaissant la proportion de glycérine à 0,75 %. La glycérine qui est comme nous le verrons une source essentielle de carbone contient un facteur nocif pour le bacille tuberculeux. Ce facteur serait une lipase.

Le milieu qui fait l'objet de cette étude est un dérivé du milieu de Lœwenstein-Jensen. C'est pour cette raison que nous donnerons ici la composition complète d'un milieu de Lœwenstein et du milieu de Lœwenstein-Jensen afin qu'on puisse commodément confronter ces milieux et voir rapidement les modifications qui ont successivement été apportées. Nous empruntons ces renseignements à H. Cassagnes (13).

MILIEU DE LŒWENSTEIN :

Solution A :

Phosphate monopotassique	1 g
Sulfate de magnésium	1 g
Citrate de sodium	1 g
Asparagine lévogyre	3 g
Glycérine bi-distillée	60 ml
Eau bi-distillée	1000 ml

Pour 300 ml de solution A :

Glycérine stérile	24 ml
Fécule de pomme de terre stérile	12 g
Œufs entiers	8
Jaunes d'œuf	2
Vert malachite à 2 %	10 ml

MILIEU DE LÆWENSTEIN-JENSEN :

Solution A :

Sulfate de magnésium	0,24 g
Phosphate monopotassique	2,4 g
Citrate de magnésium	0,6 g
Asparagine lévogyre	3,6 g
Glycérine bi-distillée	12 ml
Eau bi-distillée	600 ml

Pour 600 ml de solution A :

Fécule de pomme de terre stérile	30 g
Œufs entiers	1 l
Solution aqueuse à 2 % de vert malachite	20 ml

Parmi les innombrables milieux qui ont été proposés, nous citerons encore : milieu de Tarshis (10, 12), milieu au charbon (89), milieu de Dubos pour primo-culture en profondeur (26), milieu de Sula (49), de Yamane (32), milieu à deux couches d'Ogawa (70), milieu de Middlebrook 7H9, milieu American Trudeau Society, milieu Difco Peizer TD, milieu semi-synthétique autoclavable de Peizer (73). Des cultures ont aussi été faites sur œuf incubé et sur culture de cellule (89, 81).

Tels ont été les progrès réalisés dans la sensibilité des milieux de culture. Dans le même temps, les chercheurs amélioraient la méthode de traitement des produits pathologiques destinée à détruire la flore microbienne associée. En 1915, Petroff préconise le traitement par la soude. Puis, Bossan et Bandy proposent de remplacer la soude par l'acide sulfurique. Récemment a été proposé le traitement par différents ammoniums quaternaires. Cette méthode a été bien décrite dans la thèse de Brigitte Dottori (25), ainsi que dans des études de Viallier, Gernez-Rieux, Tison.

CHAPITRE II

VALEUR COMPAREE DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE POUR L'ISOLEMENT DU BACILLE DE KOCH A PARTIR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

Des expériences ont été réalisées pour comparer la valeur des milieux proposés pour l'isolement du bacille tuberculeux à partir des produits pathologiques.

Ainsi, Von Huth et Lieberthal montrent que pour 300 ensemencements, un milieu à l'œuf donne 190 résultats positifs contre 132 pour un milieu à la pomme de terre glycélinée.

Saenz et Costil (80) ont fait une étude comparative des différents milieux à l'œuf. Le milieu de Petraghiani modifié (asparagine au lieu du peptone) s'est montré supérieur au milieu de Lœwenstein.

Actuellement, en France, le milieu le plus employé est celui de Lœwenstein modifié par Jensen (28). Ce milieu est capable de déceler quelques unités bacillaires dans 1 cm³ de produit pathologique.

Des auteurs américains (62) ont récemment comparé la sensibilité du milieu de Lœwenstein-Jensen à différents milieux employés dans les laboratoires de Bactériologie aux Etats-Unis : milieu pénicilline — sang — Agar, milieu American Trudeau Society, milieu Difco Peizer TD, milieu Middlebrook 7H9 — agar, milieu synthétique autoclavable. Le milieu de Lœwenstein-Jensen s'est montré le plus sensible. Cependant, la différence des résultats entre le milieu de Lœwenstein-Jensen et le milieu American Trudeau Society n'est pas statistiquement significative. Ceci est encore montré dans une autre publication (46).

Kulejewska a montré que le milieu de Jensen a une sensibilité supérieure ou égale aux milieux de Sula (49), Berte, au milieu acide oléique albumine modifié (8), Ross, au milieu de Dubos (77).

Selon Hirsch (39) le milieu au charbon activé contenant des sels inorganiques, du glycérol, de l'asparagine, de l'hydrolysate de caséine une et faible proportion d'Agar semble faciliter aussi bien que les milieux à l'œuf la croissance du bacille tuberculeux.

La comparaison des méthodes de traitement des produits pathologiques a fait l'objet de très nombreuses études. Nous citerons l'étude de B. Dottori (25) où il est montré que le cétyl-diméthyl-ammonium (commercialisé sous le nom de Biocidan) apporte, par rapport à l'acide sulfurique, une augmentation du pourcentage des cultures positives de 3 pour les examens directs positifs et de 10 pour les examens directs négatifs.

CHAPITRE III

ANALYSE DES FACTEURS INTERVENANT DANS LA VALEUR DES METHODES DE CULTURE DU BACILLE DE KOCH

Dans le milieu de culture où il est ensemencé, le bacille tuberculeux doit, pour avoir une croissance régulière et normale, trouver une série d'éléments qui lui sont indispensables. Nous envisagerons successivement quelques-uns de ces facteurs. D'autres éléments interviennent concernant la méthode de traitement du produit pathologique. On sait qu'afin de détruire les germes associés, on fait agir sur les produits pathologiques mais durant un temps limité une substance à activité bactéricide.

Nous distinguerons donc les facteurs tenant aux milieux de culture et les facteurs tenant à la méthode de traitement des produits pathologiques.

I. — Facteurs tenant au milieu de culture.

a) *L'oxygène* : A la notion d'aérophilie stricte du bacille tuberculeux ont succédé des controverses d'où il a résulté des ensemencements en surface et en profondeur (26). Déjà en 1937, F. Arloing, L. Thévenot, J. Viallier avaient cultivé en anaérobiose des bacilles tuberculeux homogènes.

Selon Andrejew (2) la résistance du bacille tuberculeux à la pénurie d'oxygène ne varie suivant le milieu qu'en apparence ; par contre, elle est influencée nettement par l'âge de la culture : la résistance du bacille tuberculeux à la pénurie d'oxygène est d'autant plus grande que les bacilles sont plus jeunes. Les souches virulentes consomment plus d'oxygène que

les souches atténuées. Dans une autre publication il est indiqué que la respiration des bacilles isoniazido-résistants en voie de multiplication est moins intense que celle des bacilles sensibles.

Lyon (R.A.) (55) pense que le bénéfice ou l'effet contraire de l'aération semble dépendre de la nature de l'hydrate de carbone présent dans le milieu. Il constate que l'aération provoque une inhibition quand le milieu contient du glucose et une stimulation quand il contient du glycérol.

Halpern (37) constate que quand la tension d'oxygène diminue le temps de génération des organismes bacillaires s'élève. Il y a un abaissement progressif de la vitesse de croissance arithmétique. Aucun des organismes étudiés par cet auteur n'a été capable de présenter une croissance logarithmique quand la tension d'oxygène tombait au-dessous de 7 volumes pour 100. Rappelons enfin l'agitation des cultures en milieu liquide et en aérobiose qui permet une récolte plus abondante de bacilles.

b) *Autres facteurs* : Il semble qu'il soit difficile de les analyser et que ce n'est que par tâtonnement que l'on a amélioré les milieux de culture. Cependant nous citerons quelques essais d'analyse.

Une série d'études a été effectuée pour déterminer quels étaient les facteurs favorables à la croissance du bacille tuberculeux contenus dans le jaune d'œuf. On a d'abord montré que dans l'œuf, seul le jaune était utile. Le blanc n'a qu'un faible pouvoir nutritif. Une hydrolyse acide ou alcaline du jaune d'œuf lui enlève ses propriétés. Hirsch a ensuite (40) déterminé que le cholestérol du jaune d'œuf stimule modérément la croissance du bacille tuberculeux. Après extraction du jaune d'œuf par les solvants organiques, la fraction résiduelle provoque un accroissement considérable des souches ensemencées sur milieu au charbon. Gaind et ses collaborateurs (32) ont montré que les résultats d'une extraction varient suivant la température de l'acétone et de l'éther. Les cristaux obtenus donnent du glycérol et un acide gras dont les propriétés physiques et chimiques sont celles de l'acide élaïdique isomère de l'acide oléique. Le milieu de Yamane contenant de l'acide élaïdique donnerait des cultures plus rapides et plus souvent positives que le milieu de Löwenstein-Jensen. Norman (J.O.) (68) pense que la substance active du dialysat de jaune d'œuf est peut-

être à rapprocher du polyoside retiré du lait de noix de coco (75). Stonebrink B., a isolé par purification chromatographique la substance active contenue dans l'extrait éthéré de dialysat de jaune d'œuf. La substance aurait une relation avec le coenzyme Q ou la vitamine K. L'action de ces deux substances a été étudiée par Norman G.O. (67) qui constate une action stimulante sur une souche scotochromogène. Une étude a été faite par Finlayson (M. K.) (30) sur l'action des lipides du jaune d'œuf. Les lipides totaux, les phosphatides et les glycérides sont stimulants à l'encontre des esters méthylés et des acides gras des glycérides. Si le jaune d'œuf contient des facteurs de croissance, il contient aussi des facteurs nocifs. Lange-rova (51) a remarqué que les œufs frais contiennent des facteurs inhibiteurs dont fait probablement partie le lysozyme. A ce propos disons que le jaune d'œuf, le sérum de bœuf, la fraction V du sérum ou l'amidon possèdent le pouvoir d'inhiber des facteurs nocifs pour le bacille de Koch comme les acides gras. Ce pouvoir serait dû à une adsorption du corps toxique. L'action favorable du charbon inactivé serait aussi à rapporter à cette adsorption.

Certains auteurs ont essayé de déterminer quelles étaient les sources de carbone et les constituants du cycle de Krebs favorables à la croissance du bacille tuberculeux : Il est ainsi montré que le glycérol (63, 75) est la meilleure source de carbone. Viennent ensuite le glucose et enfin le maltose. Youmans G.P. (95, 96, 97) montre que les acides pyruvique, acétique, oxalacétique, oxalosuccinique et α — céto-glutarique assurent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* ainsi que les acides glutamique, aspartique et l'alanine. Les acides pyruvique et lactique, produits de dégradation du glucose ont une réaction supérieure à la sienne.

En ce qui concerne l'action des oligo-éléments, Patterson (72) a montré que le cobalt et le zinc stimulent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* variété avium. Sans addition de fer, le zinc resterait sans effet. Les germes cultivés en milieu contenant du zinc sont plus riches en azote. Minami (63) a montré que les phosphates sont indispensables en quantité faible, que le fer accélère la respiration, et que le magnésium est essentiel.

Le gaz carbonique à un certain taux aurait une action bénéfique sur la culture. C'est ainsi que certains auteurs ont constaté que si l'on place les tubes de culture dans un récipient où brûlait une bougie, le pourcentage des cultures positives passait de 86,5 à 95,8.

Darzins (23) a comparé l'action sur la croissance du bacille tuberculeux de l'acide désoxyribonucléique et des phytohormones comme la kinétine, l'acide 3-Indole acétique, l'acide gibbérelle. Il constate une supériorité de l'A.D.N.

Enfin nous citerons l'action des levures et de bactéries. Mankiewicz (56) a remarqué que *Candida albicans* favorisait la pousse de *Mycobacterium tuberculosis*. On pense que cette action est due à l'augmentation de pression de CO_2 et à la production de métabolites stimulants et de vitamines. Neubert et ses collaborateurs ont réussi à augmenter d'une façon considérable la croissance du bacille tuberculeux en ajoutant au milieu de culture des produits du métabolisme de mycobactéries non pathogènes. Ceci est sans doute en relation avec le phénomène d'auto-stimulation observé chez les mycobactéries.

II. — Facteurs tenant aux méthodes de traitement.

Les substances utilisées pour amener la bactéricidie des germes associés agissent aussi sur les bacilles tuberculeux mais selon une vitesse moins grande. Cela est dû à la protection lipo-protidique des mycobactéries. D'autre part le produit pathologique lui-même, transformé au cours du traitement, peut apporter une série de facteurs néfastes.

Dans sa thèse (25), B. Dottori compare plusieurs méthodes de traitement des produits pathologiques pour l'isolement du bacille tuberculeux. Avec le Désogène, sur 3.000 produits pathologiques on a 30,1 % de résultats positifs. Pour les produits positifs à l'examen direct on a 89,2 % de résultats positifs. Avec le Biocidan, sur 979 examens on a 24,5 % de cultures positives et pour les examens directs positifs, 95,8 % de résultats positifs. Ces résultats sont supérieurs à ceux donnés par le traitement à l'acide sulfurique : pour les examens directs positifs on a 3 % de cultures positives en plus, et pour les

examens directs négatifs 10 % de cultures positives en plus. De plus on a une apparition plus précoce des colonies.

Gray (35) examine l'action léthale des agents d'homogénéisation. Dans toutes les méthodes expérimentées, 80 à 100 % des bacilles tuberculeux présents étaient tués. La soude pendant 30 minutes et le phosphate trisodique pendant 18 à 24 heures ont donné les taux de léthalité les plus bas.

Hawkins (38) examine l'action de la filtration. Elle est différente suivant les filtres d'où l'importance du choix dans ce domaine.

Honda (41) étudie l'influence des conditions de conservation. Il constate que le nombre des cultures positives décroît avec le temps de conservation surtout à température ambiante.

Little (54) étudie l'intérêt de la centrifugation compte tenu de son action léthale. Il conclut qu'elle n'a pas d'intérêt pour les crachats montrant des bacilles à l'examen direct mais seulement pour les crachats négatifs.

CHAPITRE IV

PROBLEMES POSES

PAR LA CULTURE DES BACILLES TUBERCULEUX RESISTANTS A L'ISONIAZIDE

Depuis qu'est apparu le traitement des tuberculeux par l'Isoniazide, des souches résistantes ont été isolées à partir de l'expectoration des malades traités, mais aussi des malades non encore traités. Ces souches isoniazido-résistantes sont habituellement pathogènes pour l'homme (4, 45, 58, 15, 7, 71, 84) et selon certains auteurs (14) on isole de plus en plus de souches présentant un certain degré de résistance à l'Isoniazide chez les malades non encore traités.

Or, ces bacilles résistants à l'Isoniazide sont modifiés dans leur équipement enzymatique. Ce sont surtout les activités catalasique et peroxydasique qui ont été étudiées. Citons l'étude de J. Viallier et M^{lle} Cayré (90). Selon la grande majorité des auteurs (79, 88, 47, 94, 33, 59) les bacilles isoniazido-résistants ont une activité catalasique diminuée. Mais il faut noter (74, 87) que cette réduction de l'activité catalasique est plus ou moins marquée et que l'on peut classer les souches isoniazido-résistantes en plusieurs catégories en ce qui concerne cette activité. L'activité peroxydasique est aussi diminuée chez les bacilles isoniazido-résistants (85, 86). Tirunarayanan (85) affirme même qu'aucun bacille tuberculeux résistant à l'Isoniazide n'a de peroxydase et que la résistance à l'isoniazide est en relation plus étroite avec la peroxydase qu'avec la catalase.

A cette modification de l'équipement enzymatique semblent correspondre des exigences culturales particulières. Cependant, Griep (36) et Iwase (42) pensent que l'aptitude des bacilles tuberculeux à cultiver n'est pas en relation avec la résistance

à l'isoniazide. Taquet (82) montre que le délai tardif d'apparition des cultures provenant des produits biologiques courants est sans relation avec la résistance aux antibacillaires. De même David, Cardoso et Alenquer (24) obtiennent un même taux de positivité à la culture pour des bacilles résistants ou sensibles à l'isoniazide. Au contraire, Meissner (57) trouve une relation entre la difficulté de culture et la résistance à l'isoniazide. Tout d'abord il constate une augmentation de 8,6 % en 1950, à 31 % en 1953 d'ensemencements négatifs. Le fait que ces variations sont en relation avec le traitement par l'isoniazide est prouvé par la notion suivante : 17 % de cultures négatives avant la mise en route du traitement par l'isoniazide, 42 % des résultats négatifs en cours du traitement, 25 % seulement 1 mois ou 1 an après l'arrêt du traitement.

Quoi qu'il en soit nous citerons les auteurs qui ont étudié les facteurs qui agissent sur la croissance des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide. Barry et ses collaborateurs (5) montrent que le seul facteur qui provoque le développement de bacilles tuberculeux résistants à 100 μ g d'isoniazide, sur un milieu simple de Prauskauer et Beck, est le sérum. Cette action n'a pu être rapportée par ces auteurs à l'hémine, au pyruvate, ni à aucune autre fraction testée. L'addition d'autres substances comme la peroxydase brute, le chlorure ferrique, le sulfhydrate de sodium, le carbone inactivé et le charbon de sucre ne provoquait le développement que de quelques souches seulement. De même, Mitchison (64) ne voit aucun avantage à l'adjonction d'hémine ou de fraction V au milieu de Løwenstein-Jensen. Cependant, les résultats de son expérience n'ont qu'une signification limitée puisqu'elle ne porte que sur l'expectoration de 48 sujets. Cependant, Fischer (31) montre que des bacilles exposés pendant 5 semaines à une concentration de 1.000 γ /ml d'isoniazide se développent si des concentrations appropriées d'hémine, de ferricyanure de potassium ou de pyruvate de sodium sont ajoutées au milieu. L'hémine serait donc un facteur de croissance pour les souches résistantes à l'isoniazide. Peut-être est-ce la perte du pouvoir de synthèse de l'hémine qui rend ces bacilles insensibles à l'isoniazide. Le taux minimum d'hémine nécessaire est de 1 γ /ml ce qui correspond à 0,6 % de sérum de bœuf, 1 % de fraction V de sérum ou 62 γ d'hémoglobine par ml.

Dans une série de publications (59, 60, 61) Middlebrook a montré que les conditions particulières nécessaires au développement de certains mutants isoniazido-résistants sont intimement en rapport avec leur activité catalasique. Les agents de croissance disposent tous, selon cet auteur d'une activité catalasique ou analogue : catalase du foie de bœuf, hemine, sérum albumine, acide α -céto-glutarique, fer inorganique. La catalase protégerait les bacilles contre le peroxyde d'hydrogène et dans ces conditions les souches résistantes pousseraient aussi bien que les souches sauvages. L'auteur met aussi l'accent sur l'importance d'une atmosphère de CO_2 pour la croissance de certaines souches. Middlebrook affirme (61) que dans ces conditions aucun malade admis au Jewish Hospital n'a produit de crachats montrant des bacilles à l'examen direct et ne donnant pas de culture. Dans 95 % des cas la pousse s'est faite en trois semaines. Dans les autres en 30 à 35 jours. Mais l'auteur insiste sur le fait que cette méthode ne résoud pas le problème des bacilles emmurés dans les pièces d'exérèse qui très souvent sont « visibles et non viables ». Dans le même ordre d'idées, Coleman et ses collaborateurs (18) ont fait une étude de l'action du glutathion sur la croissance des souches catalase-négative de bacilles tuberculeux. Le glutathion est un inhibiteur de la croissance et la catalase, comme le pyruvate de sodium, lève cette inhibition. L'action du glutathion est attribuée en premier lieu à sa capacité de produire du peroxyde d'hydrogène.

Une autre étude intéressante a été effectuée par Darzins (23) : des cultures de B.C.G. vieilles et semi-viables conservées huit à douze jours à 5°C cultivent pauvrement ou pas du tout sur milieu solide. Les acides nucléiques (particulièrement l'A.R.N.) provoquent une croissance explosive. La culture de 59 échantillons de crachats provenant de malades ayant subi un traitement prolongé aux antibiotiques donne des résultats aussi remarquables que ceux obtenus avec les cultures de B.C.G. semi-viables.

Notons enfin que Krebs (48) pense que la glycérine est néfaste à la croissance des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide.

Gernez-Rieux et ses collaborateurs (34) ont fait une importante étude sur la culture des mycobactéries résistantes à l'iso-

niazide. Ils ont utilisé un milieu dérivé de la formule de Middlebrook et contenant de la biotine et de la catalase. Ils concluent que le milieu « biotine-catalase » est nettement plus favorable que le milieu de Jensen pour les mycobactéries devenues résistantes à l'isoniazide. Ce milieu est aussi favorable que les milieux à l'œuf pour la culture des mycobactéries sensibles. Les avantages sont constitués par l'obtention d'une plus grande proportion de cultures positives, par une plus grande rapidité d'apparition des colonies et par la mise en évidence de souches résistantes à l'isoniazide plus nombreuses. Il y a intérêt à maintenir ce milieu à un pH acide (6,3).

Des auteurs japonais proposent d'autres remèdes à ces cas d'échecs des cultures : Nishimura (66) suggère que ces cas sont peut-être dus au passage dans le milieu de culture des substances antibacillaires contenues dans les crachats des malades traités. Il propose pour remédier à cet inconvénient l'addition de 5 µg/ml d'acide para-amino-benzoïque au milieu pour la culture des bacilles tuberculeux provenant de malades traités au P.A.S. Kadoya (43) remarque tout d'abord que les cas où les bacilles sont visibles au microscope et ne donnent pas de cultures sont fréquents et qu'ils sont surtout le fait des bacilles résistants à l'isoniazide. L'auteur pense que l'échec des cultures est dû à une diminution de l'activité métabolique des bacilles qui ne peuvent croître que dans les lésions. L'auteur propose d'abandonner la méthode de diagnostic par culture et d'améliorer la technique de recherche par examen direct. Dans ce sens, il montre que la méthode d'examen direct après homogénéisation est plus sûre que la méthode utilisant la culture (44). Mais on sait bien qu'il est impossible si l'on n'a pas de culture d'étudier les caractères biologiques du germe.

Bien qu'ils ne soient pas résistants à l'isoniazide, nous incluons dans ce chapitre des bacilles tuberculeux variété bovine dont on a pensé améliorer la croissance par certaines méthodes : Stonebrink (53) a montré que son milieu au pyruvate de sodium est supérieur au milieu de Jensen, de Dubos et de Dorset pour la culture de *Mycobacterium tuberculosis* variété bovis, en ce qui concerne le délai d'apparition, la luxuriance et la contamination. Chodkowski (16) a confirmé l'utilité de ce milieu au pyruvate.

Dans cette étude des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide, nous dirons quelques mots des bacilles trouvés dans les pièces d'exérèse pour tuberculose pulmonaire, qui sont eux aussi difficiles à cultiver. Il est difficile de savoir si ces bacilles sont isoniazido-résistants puisque leur culture est le plus souvent impossible. On peut penser, comme Numata et Sakata (69) que les cas où les crachats contiennent des bacilles seulement à l'examen direct sont dus d'une part aux bacilles isoniazido-résistants, d'autre part à l'élimination du caséum contenu dans une lésion jusqu'alors fermée.

La majorité des auteurs (3, 6, 50, 78) trouve dans ces lésions un pourcentage élevé de bacilles visibles à l'examen direct et ne cultivant pas. Ce pourcentage est variable suivant la forme anatomique de la lésion. Il n'augmente pas notablement avec la durée du traitement antibiotique (50). Rusin (78) a essayé par diverses méthodes de faire revivre ces bacilles : traitement par le charbon inactivé, méthode de Hobby, primo-culture en bouillon, culture en phase, addition de phthiocol, traitement par le pyruvate, variation du milieu gazeux. Il n'a pas été obtenu de bons résultats ce qui semble confirmer l'opinion que ces bacilles sont vraiment morts.

CHAPITRE V

METHODES ET MILIEUX DE COLETSOS POUR L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX A PARTIR DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

J.-P. Coletsos (19, 20, 21, 22) considère que « deux séries de facteurs rendent aléatoire la culture du bacille tuberculeux *in vitro* » : Des facteurs tenant au bacille lui-même, appelés « facteurs intrinsèques » et des facteurs tenant aux traitements que subit le bacille avant l'ensemencement, appelés « facteurs extrinsèques ». C'est en tenant compte de ces facteurs que l'on peut espérer obtenir un pourcentage plus élevé de cultures positives.

Les facteurs extrinsèques sont :

- l'antibiothérapie : elle doit être arrêtée avant le prélèvement, trois jours pour les pulmonaires, huit jours pour les urinaires ;
- l'utilisation différée du prélèvement ;
- la non-conservation à la glacière à 4°C dans ce cas ;
- l'utilisation de l'eau physiologique à 9 pour 1.000 ;
- la purification homogénéisation.

Les facteurs intrinsèques correspondent à des modifications des bacilles attaqués par les antibiotiques, les rendant inaptes à la multiplication sur les milieux ordinaires. Ces bacilles sont de trois types : résistants aux substances antituberculeuses, persistants sensibles, bacilles en état de quiescence.

Les milieux de Coletsos parviennent selon l'auteur à suppléer à ces carences « multiples et complexes ». Les substances nécessaires à ces bacilles non viables (non cultivables, dirions-

nous) « sont comparables à celles qui existent dans l'organisme humain ».

Par ailleurs, Coletsos considère que le principe de l'aérophilie stricte du bacille tuberculeux est à réviser, si l'on veut améliorer les conditions de culture : les bacilles en état de quiescence, les bacilles provenant des lésions extra-pulmonaires, et les bacilles bovins se multiplient en aérobiose conditionnée. Le principe de l'aérophilie stricte ne demeure valable que pour la phase de multiplication active.

L'auteur remarque que la non-viabilité des bacilles rencontrés dans l'expectoration est difficilement soutenable puisque :

- il y a une élimination abondante de bacilles pendant plusieurs mois ;
- les lésions correspondantes sont évolutives ;
- les bacilles rejetés sont dangereux pour les enfants anergiques.

En résumé, ces germes dits « visibles et non viables » ont toutes les chances d'être vivants et c'est, d'abord en utilisant les méthodes de traitement les moins agressives, ensuite en cultivant ces bacilles en présence de certaines substances favorisantes et en les protégeant de l'oxygène, que l'on peut réussir à les cultiver.

Coletsos a ainsi expérimenté diverses substances susceptibles d'agir sur la croissance de ces bacilles : extraits de germes sporulés ou non, extraits de champignons, corps bacillaires tués par la chaleur ou les ultra-violets, vitamines, acides aminés, giberellines. « Il n'a pas été trouvé de dénominateur commun à tous les résultats positifs obtenus. Seuls, les pyruvate et glutamate de sodium incorporés au milieu à des taux bien définis et les oligo-éléments suivant la formule de A. Berthelot (9) ont répondu favorablement à cette exigence ».

Quant à l'oxygénation, Coletsos pense qu'elle est néfaste aux deux premières phases de la culture (phases d'adaptation, et de multiplication lente). Il suffit d'isoler passagèrement les bacilles de l'air ambiant par une mince pellicule de gélatine pour les voir accéder à la phase active dans des délais écourtés et sensiblement comparables à ceux nécessaires aux bacilles ordinaires.

Ainsi, le milieu de Coletsos est un milieu à l'œuf, type Loewenstein-Jensen, auquel il est rajouté après coagulation et par litre d'œuf :

- pyruvate de sodium : 1,5 g ;
- glutamate de sodium : 1,5 g ;
- solution oligo-dynamique de A. Berthelot et G. Bertrand : 1,5 ml ;
- gélatine fluidifiée (20 % d'eau distillée) neutralisée à p H7 et autoclavée 30 minutes à 110°C : 30 ml ;
- tournesol hydrosoluble stérile (RAL) : 0,75 g.

La composition complète de ce milieu est donnée dans le tableau suivant :

Composants	Pour 1 litre d'œuf 1,600 litre de milieu terminé	Pour 100 ml de milieu terminé
Phosphate monopotassique	2,4 g	0,15 g
Sulfate de magnésium	0,24 g	0,015 g
Citrate de magnésium	0,6 g	0,0375 g
Asparagine G	3,6 g	0,225 g
Pyruvate de sodium	1,6 g	0,1 g
Glutamate de sodium	1,6 g	0,1 g
Bleu de tournesol R.A.L.	0,4 g	0,025 g
Cendres d'antracite	0,16 g	0,01 g
Solution oligo-dynamique	1,6 ml	0,1 ml
Glycérine bi-distillée	12 ml	0,75 ml
Fécule de pomme de terre	16 g	1, g
Vert malachite à 2 %	16 ml	1 ml
Eau distillée	440 ml	27,5 ml
Osséine stérile à 4 % pH 6,8 ..	160 ml	10 ml
Œufs entiers	800 ml	50 ml
Jaune d'œufs	200 ml	12,5 ml

Cette description correspond au milieu de base (milieu B) qui servira pour l'ensemencement en aérobiose.

Pour tenir compte de l'action nocive de l'oxygène aux deux premières phases du développement, a été mise au point la méthode de culture « sous cape » : les germes sont isolés de l'air aux deux phases initiales par une mince pellicule de gélatine exsudée par le milieu. Pour cela, le milieu pour culture

sous cape contient un taux d'osséine plus élevé que le milieu de base : 160 ml d'osséine à 20 g pour cent au lieu de 160 ml à 4 g pour cent. Ce deuxième milieu est le milieu base-osséine (milieu B-O).

Il existe un troisième milieu que Coletsos donne pour plus sensible encore. Il est réalisé en ajoutant extemporanément (risques d'altération par chauffage à 85°C lors de la coagulation) des extraits d'organes frais (poumons, cerveau, foie, reins) de cobaye, de lapin ou de veau. Ceci réalise le milieu à double couche nutritive. La préparation du foie ou du rein de singe est identique à celle appliquée aux organes devant servir à la culture de tissus. On fait une suspension finale de la pulpe en eau distillée stérile à 25 g pour 100, puis une répartition stérile en ampoules de 5 ml avec tyndallisation à 54°-56°C. La conservation est assurée pendant 3 à 6 mois par séjour à 4° à la glacière.

En résumé, Coletsos propose trois milieux : le milieu de base (B), le milieu base-osséine (B-O) pour la culture sous cape, et le milieu à double couche nutritive.

Tous ces milieux n'ont pas les mêmes indications. L'ensemencement en surface reste valable pour les bacilles provenant des poumons de malades non encore traités. On stimulera même la respiration microbienne par le P.A.B. antagoniste du P.A.S. La méthode de culture sous cape convient aux bacilles bovins, aux bacilles humains provenant de lésions extra-pulmonaires, et aux bacilles en état de quiescence. La méthode de culture à double couche nutritive sera réservée aux bacilles profondément modifiés dans leur métabolisme.

CHAPITRE VI

ETUDE DES RESULTATS OBTENUS PAR L'UTILISATION SYSTEMATIQUE DES MILIEUX DE COLETSOS

Nous avons utilisé le milieu Coletsos-base dans différentes circonstances. Rappelons d'abord sa constitution, ses principales caractéristiques et ses indications : bacilles provenant de malades saturés d'antibiotiques qui ne cultivent pas sur milieux usuels et qui, inoculés au cobaye, ne le tuberculisent pas ; bacilles dits visibles et non viables. Ces milieux comportent une substance active capable de réanimer ces bacilles dont la non-viabilité, pensait Coletsos, était plus apparente que réelle. Le pyruvate et le glutamate de sodium incorporés aux milieux à des taux définis et les oligo-éléments suivant la formule de Berthelot répondent à cette exigence. Nous avons donc utilisé de façon systématique le milieu Coletsos-base dans les trois conditions suivantes :

- pour la mise en évidence de mycobactéries tuberculeuses ou non tuberculeuses dans les viscères de souris inoculées avec ces mycobactéries.
- pour la mise en évidence du bacille tuberculeux dans l'expectoration de malades atteints ou suspects de tuberculose pulmonaire, avant, en cours ou après traitement antibiotique.
- pour la culture de souches réputées non cultivables.

I. — Recherche de mycobactéries tuberculeuses ou non tuberculeuses dans les viscères de souris inoculées avec ces mycobactéries.

Nous avons procédé de la manière suivante : des souris ont été inoculées par voie intra-veineuse ou intra-péritonéale avec des souches isolées antérieurement de mycobactéries non tuberculeuses appartenant aux espèces *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium aquae*, Mycobactéries du groupe *avium*, ou de mycobactéries tuberculeuses. Parfois l'introduction des mycobactéries a été réalisée par ingestion. Plusieurs séries d'animaux ont été utilisées : souris blanches de race Swiss, de race M.L. ou de race P.L. (race à incidence cancéreuse élevée). Les animaux morts ont été placés au réfrigérateur le plus rapidement possible ; mais l'autopsie a été faite parfois tardivement plusieurs jours après la mort. Par contre, pour les animaux sacrifiés, les prélèvements viscéraux ont été effectués immédiatement après la mort. De toute façon pour chaque animal inoculé on a procédé à un prélèvement de rate, de rein et de poumon. Le fragment a été broyé au mortier, puis repris dans l'eau distillée stérile. Si le broyat est effectué suffisamment longtemps on obtient une suspension suffisamment homogène pour qu'il ne soit pas nécessaire de filtrer. Dans le cas contraire, une filtration élimine les gros fragments ce qui diminue les risques de contamination. Puis, le broyat a été divisé en deux portions. L'une a été traitée par l'acide sulfurique, puis neutralisée par la soude. L'autre a été traitée par un ammonium quaternaire : le Cétyle-diméthyl - ammonium-bromure-lauryl - diméthyl-benzyl-ammonium. Voici exactement la technique qui a été suivie pour le traitement du broyat :

1° Technique utilisée dans le cas de traitement par l'acide sulfurique :

A 2 ml d'acide sulfurique on ajoute environ 2 ml de suspension de viscères. On agite plusieurs fois à l'aide d'une pipette Pasteur et l'on laisse agir l'acide pendant 4 à 5 minutes. On neutralise ensuite par la soude, titrée au préalable (8 ml de soude neutralise exactement 2 ml d'acide). Après une centri-

fugation de 10 minutes à 6.000 tours/minute, on rejette le surnageant. On remplit le tube avec de l'eau distillée, on agite, et on centrifuge de nouveau 10 minutes à 6.000 tours/minute. On rejette alors l'eau distillée. On reprend le culot dans un peu d'eau.

2° *Technique utilisée dans le cas de traitement par l'ammonium quaternaire :*

A 3 ml de cétyl-diméthyl-ammonium dilué au 500^e on ajoute environ 2 ml de suspension de viscères. On agite à l'aide d'une pipette Pasteur et on laisse agir 90 minutes jusqu'à la fin d'une première centrifugation à 6.000 tours/minute. On rejette alors le surnageant que l'on remplace par de l'eau distillée. On centrifuge. On effectue un deuxième rinçage mais on laisse la suspension en contact avec l'eau distillée pendant environ 18 heures. On centrifuge alors pendant 10 minutes à 6.000 tours/minute. On rejette l'eau distillée.

Les produits traités ont étéensemencés sur deux milieux de Lœwenstein-Jensen et un milieu Coletsos-base.

La présence de colonies a été recherchée durant les 50 premiers jours de séjour à l'étuve à 37°C. Puis, ultérieurement les tubes ensemencés ont été laissés à l'étuve à 37° jusqu'au centième jour. Les résultats sont consignés dans les tableaux suivants.

1° SOURIS INOCULÉES AVEC DES MYCOBACTÉRIES ATYPIQUES.

Pour 102 souris ayant fourni 305 prélèvements et au total 610 échantillons traités par l'une et l'autre des deux méthodes, voici les résultats :

TABLEAU I

	Traitement par l'acide	Traitement par l'ammonium	TOTAL
CONCORDANCES	—	—	—
Deux milieux positifs	64	66	130
Deux milieux négatifs	220	210	430
Ensemencements non valables	9	9	18
DISCORDANCES			
Jensen O Coletsos +	5	11	16
Jensen + Coletsos O	7	9	16
Total	305	305	610

Dans cette expérimentation concernant des mycobactéries atypiques et des animaux non traités, la plupart des souches isolées a poussé sur les deux milieux. Les discordances sont tantôt en faveur de l'un, tantôt en faveur de l'autre des deux milieux sans que l'on puisse mettre en évidence une divergence systématique.

Nous ne pouvons dans ce court exposé tenir compte de l'espèce à laquelle appartenait la mycobactérie inoculée. Dans l'ensemble, les cultures positives appartenaient à des souches de *Mycobacterium kansasii*. Celles-ci persistaient et se multipliaient dans les viscères plusieurs mois après l'inoculation.

Quant à l'influence de la méthode de traitement, l'ammonium quaternaire donne un léger pourcentage en plus de cultures positives. Il présente une agressivité moins grande, contrebalancée par un risque plus grand de contamination par les germes provenant de la bactériémie agonique.

2° SOURIS INOCULÉES AVEC DES MYCOBACTÉRIES TUBERCULEUSES DE VIRULENCES DIVERSES.

Pour 39 souris ayant fourni 116 prélèvements soit au total 232 échantillons, voici les résultats :

TABLEAU II

	Traitement par l'acide	Traitement par l'ammonium	TOTAL
CONCORDANCES			
Deux milieux positifs	59	54	113
Deux milieux négatifs	40	44	84
Résultats non valables	5	6	11
DISCORDANCES			
Jensen O Coletsos +	4	4	8
Jensen + Coletsos O	8	8	16
Total :	116	116	232

Ces résultats pourront paraître surprenants. Le nombre élevé de résultats négatifs s'explique par le prélèvement systématique et l'ensemencement de tissu splénique et de tissu rénal, qui ne renferment pas toujours ou ne renferment que plus tardi-

vement des bacilles lors de la tuberculose expérimentale de la souris. Il s'explique encore par l'inoculation de certaines souris par voie intra-péritonéale, par l'utilisation de lignées peu sensibles à la tuberculisation. Certains animaux ont pu être inoculés par voie péri-veineuse au niveau de la queue et non dans la veine elle-même, et ont été sacrifiés indemnes de tuberculose macroscopique. La majorité des souches utilisées était isoniazido-résistante, l'une d'elles avait une virulence, semble-t-il, pratiquement nulle pour le cobaye. Les conditions étaient donc favorables à l'étude des qualités du milieu de Coletsos puisque les germes étaient certainement dans de nombreux prélèvements en petit nombre et en état physiologiquement anormal. Or, le nombre de discordances ne montre pas une supériorité du milieu de Coletsos, au contraire. Cependant le nombre des discordances est trop faible, semble-t-il, pour qu'on puisse en tirer une certitude quant à la valeur des milieux.

3° SOURIS INOCULÉES AVEC DES SOUCHES HOMOGÈNES DE BACILLES TUBERCULEUX.

Rappelons que sous ce nom, on désigne des souches particulières de mycobactéries tuberculeuses. S. Arloing s'adressant à des souches humaines ou bovines de bacilles tuberculeux les a transformées par culture en eau peptonée glycinée et par agitation en des souches de mycobactéries poussant de façon homogène et ayant perdu leur virulence pour l'animal. Nous avons inoculé à la souris un certain nombre de ces souches provenant de la collection P. Courmont pour étudier leur pouvoir pathogène pour cet animal et leur possibilité de multiplication dans les viscères. Lesensemencements ont été réalisés comme pour les deux expérimentations précédentes. Voici les résultats :

Pour 33 souris ayant fourni 99 prélèvements et 198 échantillons nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU III

	Traitement par l'acide	Traitement par l'ammonium	TOTAL
CONCORDANCES			
Deux milieux positifs	26	29	55
Deux milieux négatifs	59	54	113
Résultats non valables	6	10	16
DISCORDANCES			
Jensen O Coletsos +	2	1	3
Jensen + Coletsos O	6	5	11
Total :	99	99	198

Rappelons que ces souches sont isoniazido-résistantes, qu'elles ont une activité catalasique importante. Elles sont caractérisées par un développement abondant et facile ne faisant pas intervenir de besoins nutritifs spéciaux. Certains auteurs pensent qu'il s'agit de bacilles aviaires ou de mycobactéries ayant acquis les caractères d'un bacille aviaire. Le tableau montre des discordances en faveur du milieu de Jensen. Mais étant donné que les bacilles n'avaient pas d'exigence spéciale, il était prévisible que le milieu de Coletsos ne se montrerait pas supérieur au milieu de Jensen.

Dans l'ensemble, cette étude a porté sur 317 prélèvements viscéraux de souris. Aucun de ces animaux n'était en cours de traitement. Les prélèvements étaient plus ou moins riches en mycobactéries ou en étaient exempts. Les mycobactéries en tous cas n'étaient pas soumises à une agression chimiothérapique quelconque. Dans de telles conditions les bacilles se développent normalement sur les différents milieux de culture, et nous ne pouvons des chiffres obtenus conclure que le milieu de base utilisé apporte un élément favorable ou défavorable et au contraire même, dans tous les cas, le nombre des discordances Jensen + Coletsos O est supérieur à celui de Jensen O Coletsos +. Ceci est peut-être particulièrement net en ce qui concerne les bacilles homogènes qui habitués primitivement à croître en culture agitée donc riche en oxygène, sont particulièrement exigeants comme germes aérophiles.

Une deuxième série d'expériences a été effectuée plus récemment. Elle concerne aussi l'utilisation du milieu Coletso-base pour la culture de mycobactéries atypiques, de mycobactéries tuberculeuses, et de souches homogènes de bacilles de Koch inoculées à la souris. La même technique a été suivie. Mais ici il a été tenu compte du résultat de l'examen direct. Cette façon d'exposer les résultats est plus intéressante pour nous qui nous sommes donné pour but de savoir s'il était possible, en utilisant le milieu de Coletso, de réduire le nombre des bacilles qui bien que visibles à l'examen direct ne donnent pas de culture. Nous ne donnerons que les résultats de la culture des produits dans lesquels ont été trouvés des bacilles à l'examen direct.

1° *Souris inoculées avec des mycobactéries atypiques.*

51 souris ont été inoculées et ont fourni 153 prélèvements. L'ensemencement des 24 prélèvements où des bacilles avaient été vus à l'examen direct a donné les résultats suivants. Dans ce tableau (tableau IV) nous avons noté J + et C + les résultats positifs respectivement sur le milieu de Jensen et le milieu Coletso-base, JO et C O, les résultats négatifs, J cont et C cont, les cas où il y a eu contamination.

TABLEAU IV

	Acide sulfurique	Biocidan	TOTAL
	—	—	—
J + C +	9	12	21
J O C O	13	9	22
J + C O	1	0	1
J O C +	0	1	1
J O C cont	0	1	1
J cont C O	0	1	1
J cont C cont	1	0	1

Nous constatons que sur 24 prélèvements où des bacilles avaient été vus à l'examen direct, 13 n'ont pas donné de culture sur les deux milieux quand l'acide sulfurique était utilisé pour

le traitement des produits pathologiques, et 9 quand le cétyl-diméthyl-ammonium était utilisé. Le milieu Coletsos-base n'a pas résolu dans ce cas le problème de la culture des bacilles visibles à l'examen direct. Le nombre des cas où les bacilles ont poussé sur un seul des deux milieux est égal pour les deux milieux. Le nombre des cultures positives obtenues en plus grâce à l'utilisation du milieu Coletsos-base est très faible. Nous avons par ailleurs remarqué que les bacilles visibles à l'examen direct et qui ne donnaient pas de culture appartenaient plus souvent (4 fois) à une souche de *Mycobactérium kansasii*.

2° *Souris inoculées avec des souches de bacille de Koch de virulences diverses.*

39 souris ont été inoculées et ont fourni 116 prélèvements. Sur ces 116 prélèvements, 60 présentaient des bacilles de Koch à l'examen direct et leur ensemencement a donné les résultats consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU V

	Acide sulfurique	Biocidan	TOTAL
	—	—	—
J + C+	39	40	79
J O C O	11	11	22
J + C O	4	3	7
J O C +	4	2	6
J + C cont	1	0	1
J cont C Cont	1	4	5

Malgré l'utilisation des deux milieux, sur 60 prélèvements où des bacilles de Koch avaient été vus à l'examen direct, 11 n'ont pas donné de culture quel qu'ait été le mode de traitement. L'utilisation du milieu Coletsos-base nous a permis de mettre quatre fois en évidence les bacilles qui n'auraient pas poussé si seul le milieu de Jensen avait été utilisé ; ce résultat a été obtenu avec le traitement par l'acide sulfurique ; avec le traitement par le cétyl-diméthyl-ammonium le milieu Coletsos-base a permis de cultiver 2 produits qui n'auraient

pas poussé sur le milieu de Jensen. Les résultats obtenus ne font pas ressortir dans l'ensemble la supériorité de l'une quelconque des deux méthodes de traitement. Mais les chiffres sont trop faibles pour tirer une conclusion certaine.

3° *Souris inoculées avec des souches homogènes de bacilles tuberculeux.*

33 souris ont été inoculées et ont fourni 99 prélèvements. Parmi ces 99 prélèvements 19 présentaient des bacilles de Koch à l'examen direct et leur ensemencement a donné les résultats suivants :

TABLEAU VI

	Acide sulfurique	Biocidan	TOTAL
	—	—	—
J + C +	12	13	25
J O C O	3	5	8
J + C O	1	0	1
J O C +	0	0	0
J O C cont	1	0	1
J cont C cont	2	1	3

Sur les 19 prélèvements où existaient des bacilles visibles à l'examen direct, 3 n'ont pas donné de culture quand on a utilisé le traitement par l'acide sulfurique et 5 quand on a utilisé le cétyl-diméthyl-ammonium. Nous constatons que le nombre de souches isolées aurait été le même si le milieu de Coletsos n'avait pas été utilisé concouramment au milieu de Jensen.

II. — Utilisation systématique du milieu Coletsos-base pour la mise en évidence du bacille tuberculeux dans les produits pathologiques humains.

Recevant chaque jour dans son service de Bactériologie de l'hôpital Jules-Courmont et de l'hôpital Sainte-Eugénie un grand nombre de produits pathologiques humains, provenant de tuberculeux pulmonaires ou autres, M. Viallier a été frappé comme

beaucoup d'autres auteurs par les variations du pourcentage de bacilles dits non cultivables. Le nombre de produitsensemencés chaque jour, l'absence de renseignements les accompagnant, l'impossibilité de toute enquête sur leur provenance, nous ont fait rechercher l'utilisation d'une méthode ou d'un milieu qui abaisserait le pourcentage de ces bacilles non cultivables. Les impératifs d'un service hospitalier de biologie, les variations et l'importance du nombre des recherches demandées chaque jour, la petite quantité de produits pathologiques adressés, l'exiguïté des locaux et des étuves ne nous ont pas permis de faire ces recherches sur une grande échelle.

Nous nous sommes adressés au milieu Coletsos-base et l'avons utilisé de façon systématique. Les produits pathologiques adressés au laboratoire ont été traités par le cétyl-diméthyl - ammonium - bromure - lauryl - diméthyl - benzyl - ammonium selon la méthode que nous avons préconisée, puis après lavage, ensemencés sur la surface de deux milieux de Jensen et d'un milieu Coletsos-base. La quantité valable de produits pathologiques apportée au laboratoire empêche le plus souvent l'utilisation d'un plus grand nombre de milieux. Il est aussi difficile d'effectuer deux prélèvements par exemple sur la même expectoration ; les ensemencements risqueraient de ne pas être équivalents. Malgré toutes les précautions prises, du reste, on doit toujours songer à la non-équivalence des particules prélevées et ensemencées. Certains produits sont particulièrement pauvres en bacilles de Koch, d'autres apportent, lorsqu'il s'agit de tuberculeux soumis déjà à de longs traitements antibiotiques, de minuscules particules purulentes qui restent noyées dans du mucus ou de la salive et où le tri s'avère difficile.

Les milieux de culture ont été examinés régulièrement toutes les semaines, laissés à l'étude un peu plus de cent jours. Les cultures positives ont été considérées comme telles quel que fussent le nombre de colonies et la date de leur apparition. Dans quelques cas, assez rares il est vrai, des contaminations se sont développées. Nous n'en avons tenu compte que lorsque, ayant envahi la surface du milieu de culture, elles ont empêché la mise en évidence de colonies de bacilles tuberculeux.

Cette étude a été effectuée dans un laboratoire de bactériologie hospitalier où un grand nombre d'expectorations prove-

nait de tuberculeux pulmonaires déjà plus ou moins longuement traités et encore en cours de traitement, la tuberculose étant souvent de connaissance déjà ancienne. Nous répétons qu'ils nous a été impossible d'avoir des renseignements sur l'état de chaque malade et de son traitement actuel. Nous sommes donc loin d'avoir respecté les conditions qu'a posées J. Coletsos pour avoir le maximum de chances de cultiver les bacilles, à savoir l'arrêt du traitement, 3 jours avant le prélèvement. Mais les conditions dans lesquelles nous avons travaillé sont en réalité celles qui existent dans tout laboratoire hospitalier où le bactériologiste doit tenir compte des exigences et des impératifs de la clinique humaine.

Le but que nous nous étions fixé étant de faire disparaître les bacilles visibles et non viables, c'est la classification en produits dont l'examen direct était positif et produits dont l'examen direct était négatif qui sert de base à l'exposé de nos résultats.

TABLEAU VII

	Concordances		Discordances		Cultures Contaminées
	Jensen Coletsos +	Jensen O Coletsos O	Coletsos + Jensen O	Coletsos O Jensen +	
Examen					
Direct +	488	102	30	24	4
Examen					
Direct —	229	4.204	63	39	3
TOTAL	717	4.306	93	63	7

Le total des cultures effectuées a été de 5.186.

On est frappé dans cette statistique par l'importance des concordances. Les discordances sont au nombre de 3 % seulement si l'on considère l'ensemble des cultures positives et négatives. Les discordances en faveur du milieu Coletsos-base sont plus nombreuses que celles en faveur du milieu de Jensen ; ceci est vrai aussi bien pour les produits positifs à l'examen direct que pour les produits négatifs.

Nous n'avons pu déterminer de façon exacte à quoi correspondent les souches n'ayant poussé que sur le milieu de Jensen ou celles n'ayant poussé que sur le milieu de Coletsos. En particulier, il nous a été impossible de connaître exactement leur sensibilité à l'isoniazide.

La seule conclusion que l'on puisse tirer de ces chiffres est que le milieu Coletsos-base nous permet de récupérer un nombre important de souches qui n'auraient pas poussé si l'on n'avait utilisé que le milieu de Jensen. Et inversement, l'emploi du milieu de Coletsos seul nous ferait perdre un certain nombre de résultats positifs.

On nous objectera sans doute que nous n'avons utilisé qu'un seul milieu Coletsos-base alors que nous ensemencions deux milieux de Jensen et que de ce fait le milieu de Coletsos était défavorisé. Nous le reconnaissons volontiers et pensons qu'il faut en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

Il semble ressortir de ce tableau que l'utilisation simultanée des deux milieux (Coletsos et Jensen) et à plus forte raison du seul milieu de Coletsos ne résoud pas le problème des bacilles visibles et non viables. Il subsiste en effet un nombre important (102 sur 648, soit environ 16 %) de cas où les ensemencements sont restés négatifs bien que l'examen direct ait été positif. S'agit-il uniquement de bacilles non cultivables ? Nous ne le pensons pas. Ces cas ont été recueillis avant tout durant une période de deux mois. L'enquête effectuée à ce moment nous a permis de noter qu'une étuve nouvellement utilisée chauffait par conduction les parois des tubes de culture et l'absence de culture provenait peut-être des conditions thermiques défectueuses où ces tubes avaient été placés. Ce fait est intéressant parce qu'il met en évidence que le développement des colonies de bacilles de Koch est le fruit de tout un concours de circonstances. Le milieu de culture n'est qu'un des éléments peut-être le principal. Aussi, lorsqu'on parle de bacilles de Koch non cultivables est-il nécessaire de s'entourer de précautions pour savoir si ce ne sont pas les conditions où sont placés les germes qui sont responsables de l'absence de culture.

Pendant tout le temps où cette erreur de technique n'est pas intervenue nous avons eu, en utilisant les deux milieux, un nombre très faible de cultures négatives pour des produits pathologiques renfermant des bacilles visibles à l'examen direct. Mais répétons-le, le milieu de Coletsos utilisé seul ne nous aurait pas permis d'obtenir ce résultat.

Une autre série de recherches concernant l'utilisation systématique du milieu de Coletsos pour la recherche du bacille

tuberculeux dans les produits pathologiques a été effectuée dans un autre laboratoire. Un total de 8.466 ensemencements a été réalisé suivant la même technique et en utilisant pour chaque ensemencement la surface de deux milieux de Jensen et d'un milieu Coletsos-base. Les produits pathologiques (expectoration et liquide de tubage gastrique) provenaient essentiellement de malades non encore traités ou de malades non en cours de traitement antibiotique. Quelques-uns des produits pathologiques provenaient cependant de services hospitaliers ou de sanatorium. Le groupe de malades concernant ces résultats est donc différent du groupe précédent quant à l'imprégnation par les antibacillaires. Ceci est intéressant à noter puisque le milieu de Coletsos est en principe surtout favorable aux souches à métabolisme anormal. Nous devrions nous attendre à obtenir dans cette statistique des résultats moins favorables au milieu de Coletsos que dans la statistique précédente. Voici les résultats que nous avons obtenus. Dans ce tableau (Tableau VIII) nous avons noté J + et J O les résultats positifs et négatifs sur le milieu de Jensen, B + et B O, les résultats positifs et négatifs sur le milieu Coletsos-base, J cont et B cont les résultats où il y a eu contamination pour l'un ou l'autre des milieux.

TABLEAU VIII

	J + B +	J O B O	J + B cont	J cont B +	J cont B cont	J O B +	J + B O	Total
Examen direct +	320	23	3	1	7	10	10	374
Examen direct —	211	4.990	2	0	108	30	53	5.394
Examen direct non pratiqué	313	2.272	2	1	54	25	34	2.701
TOTAL	844	7.285	7	2	169	65	97	8.469

L'examen de ces résultats quoique légèrement différents des précédents incite à des conclusions superposables. Dans l'ensemble il y a concordance dans les résultats apportés par les différents milieux, que l'examen direct ait été positif ou

négatif. Le milieu de Jensen donne cependant un peu plus de résultats positifs. Là aussi l'utilisation d'un seul milieu de culture aurait abaissé le nombre de résultats positifs, et les chiffres obtenus dans ce groupe de produits nous font insister sur la nécessité d'utiliser systématiquement les deux variétés de milieux. Le pourcentage des bacilles de Koch que l'on pourrait qualifier de non cultivables est de 6,1 (23 sur 374), chiffre relativement élevé. Là encore les produits arrivant sans renseignements il nous a été impossible de savoir à quoi ils correspondaient. Peut-être s'agissait-il de prélèvement effectués chez des sujets en cours de traitement antibiotique.

III. — Utilisation systématique des milieux Coletsos-base et Coletsos-base-osséine mise en évidence de bacilles tuberculeux réputés non cultivables dans les produits pathologiques humains.

Nous avons pensé, lorsque nous nous sommes intéressés à la question des bacilles de Koch non cultivables, pouvoir apporter une statistique d'essais expérimentaux. Nous pensions en effet pouvoir recevoir un nombre suffisant de produits pathologiques renfermant de tels bacilles de Koch non cultivables, c'est-à-dire morphologiquement présents dans les produits pathologiques normalement colorables par la méthode de Ziehl mais ne donnant pas de culture après traitement et ensemencement sur milieu de Jensen. Lorsque nous était adressée une expectoration où des bacilles de Koch étaient présents à l'examen direct et qui n'avaient pas donné naissance à des cultures, nous avons renouvelé l'examen direct sur une nouvelle expectoration du même malade. Dans l'immense majorité des cas, la nouvelle expectoration ne renfermait plus de bacilles tuberculeux visibles après coloration. Il nous fallait conclure que les bacilles qui avaient été vus lors du précédent examen étaient les derniers qui avaient été éliminés par le malade et nous pouvions supposer qu'ils étaient morts. Nous pouvions attribuer l'échec de la culture à l'état dégénératif de ces bacilles. Dans quelques autres cas, la nouvelle expectoration donna naissance à des cultures. Les bacilles qui n'avaient pas poussé au premier examen étaient-ils dans ce cas de véritables bacilles visibles et

non viables ? Nous ne le pensons pas et attribuons plutôt l'échec de la culture à l'intervention de différents facteurs nocifs tels que la présence d'un antibiotique dans le prélèvement, l'action du traitement, le séjour prolongé du prélèvement à température ordinaire.

En résumé, les malades qui nous étaient adressés pour l'étude de ces bacilles visibles et non cultivables ne nous ont pas semblé rejeter de tels bacilles et nous n'avons pu nous servir de leur expectoration pour établir une statistique sur la valeur du milieu de Coletsos pour la culture des bacilles réputés non cultivables.

Nous n'avons eu à notre disposition que de rares malades éliminant continuellement des bacilles visibles et non cultivables. Trois malades nous ont fourni 8 expectorations qui ont été traitées pour une part par la technique classique utilisant l'acide sulfurique, pour une autre part, par la technique utilisant un ammonium quaternaire. Chaque prélèvement ainsi traité a été ensemencé sur deux milieux Coletsos-base, deux milieux Jensen, et deux milieux Coletsos-base-osséine avec lymphé de singe. Lorsque cela a été possible le produit a été inoculé à deux cobayes et pour l'un d'eux en même temps que du sable. Il est certain que tous ces produits renfermaient des bacilles de Koch morphologiquement identifiables après coloration sur les frottis.

Le premier sujet a donné lieu à un prélèvement. Tous les ensemencements sont restés stériles ; les cobayes sont morts sans qu'à l'autopsie il ait été décelé de lésions de tuberculose expérimentale.

Le deuxième sujet tuberculeux pulmonaire chronique cavitaire, soigné par antibiotiques depuis de nombreuses années, fournissait une expectoration abondante. L'examen direct y décelait constamment des bacilles tuberculeux. Le premier prélèvement n'a pas donné de culture. Le deuxième prélèvement a été ensemencé après traitement par l'ammonium quaternaire sur milieu de Jensen, Coletsos-base, Coletsos-base-osséine plus lymphé de singe. Les tubes sont restés stériles. L'ensemencement sur les mêmes milieux après traitement par l'acide sulfurique nous a permis d'obtenir des cultures dans tous les milieux. Cette souche était sensible à l'isoniazide entre 0,5 et 1 μ g par ml. Pour le troisième prélèvement, les cultures sont restées stériles

et deux cobayes inoculés n'ont pas été tuberculisés. Avec le quatrième prélèvement, les milieux de base après traitement par l'ammonium quaternaire sont restés stériles. Un milieu base-osséine a permis l'obtention d'une culture tardive (100^e jour) ; il en a été de même pour le milieu de Jensen. La souche isolée était insensible à l'isoniazide. Pour le cinquième prélèvement, quel qu'ait été le procédé de traitement, les ensemencements sur milieu de base ont donné naissance à des cultures d'apparition tardive.

L'expectoration du troisième sujet, quel qu'ait été le procédé de traitement, n'a pas donné de culture sur le milieu de Jensen et n'a pas tuberculisé le cobaye.

De ces quelques données nous ne voudrions tirer aucune conclusion, mais il semble que cette question des bacilles tuberculeux non cultivables dans les produits pathologiques soit particulièrement complexe. Chez de tels malades il est nécessaire non seulement de multiplier les examens, mais aussi de multiplier les procédés de traitement et les milieux de culture utilisés. Les souches isolées chez de tels malades sont en général insensibles aux antibiotiques en particulier l'isoniazide. Ceci n'est qu'une image très fausse de la réalité puisque la détermination de la sensibilité est effectuée en général à partir de l'unique colonie ayant poussé. Là encore, peut-être, ne faut-il voir dans le milieu de culture qu'un des éléments du problème.

CONCLUSIONS

I. -- La question des bacilles tuberculeux non cultivables présents dans les produits pathologiques humains reste un sujet de préoccupations pour les bactériologistes et les cliniciens. On ne peut admettre qu'il s'agisse de bacilles morts. Il s'agit en fait de germes à caractères métaboliques anormaux. Pour les isoler et permettre leur culture, il faut préciser les conditions du prélèvement, utiliser plusieurs méthodes de traitement des produits pathologiques, et ensemercer sur des milieux de culture appropriés.

II. — Lorsque les cultures sont effectuées de façon systématique à partir de prélèvements chez des malades pour lesquels on n'a pas de renseignements précis, il est toujours utile d'adjoindre le milieu Coletsos-base au milieu de Lœwenstein-Jensen. Ce milieu permet d'isoler un certain nombre de souches qui ne se développent pas sur le milieu de Jensen.

Le milieu Coletsos-base utilisé dans les conditions que nous avons indiquées ne nous a pas permis d'obtenir des cultures pour tous les produits qui avaient montré des bacilles à l'examen direct.

III. -- La qualité du milieu d'ensemencement ne résoud pas totalement le problème des échecs de la culture : en utilisant deux types de milieux, nous n'avons pu réduire à néant les cas de bacilles non cultivables. Il semble qu'il soit difficile d'obtenir une réussite dans tous les cas et que des conditions autres que le milieu de culture interviennent.

IV. — Bien que nous n'ayons pas pu faire une étude systématique suffisante des bacilles tuberculeux non cultivables, habituellement présents à de multiples examens de l'expectoration, nous n'avons pas pu mettre en évidence une supériorité évidente et constante du milieu Coletsos-base-osséine additionné de lymphé de singe.

Vu :
Le Doyen,
J. F. CIER.

Vu :
Le Président de la Thèse,
Professeur P. GIRARD.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 12 Novembre 1963.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDREJEW (A.). — Sur la végétation du bacille de Koch en profond. *Ann. Inst. Past.*, 1946, t. 72, 891-907.
2. ANDREJEW (A.). — Métabolisme respiratoire de divers types de bacilles paratuberculeux. *Ann. Inst. Past.*, 1946, t. 72, 611-621.
3. ANDO (Y.). — Etude morphologique et bactériologique sur les lésions réséquées de tuberculose pulmonaire. II. *Etude bactériologique. Kekkaku*, 1959, t. 34, 979.
4. ASSARAF (W.). — Contribution à l'étude de la virulence des bacilles de Koch isoniazido-résistants. Valeur comparée des différents tests de virulence. *Thèse Alger*, 1956.
5. BARRY (V.C.) et CONALTY (M.L.). — Etude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à l'isoniazide. I. - Conditions nécessaires au développement de souches résistantes à 100 γ /ml d'isoniazide. II. - Virulence pour la souris et les cobayes et aspect de la croissance (en corde) in vitro des souches résistantes à 100 γ /ml d'isoniazide. *Am. Rev. of Tub.*, 1955, t. 71, 785-798.
6. BARUAD. — Etude bactériologique des poumons tuberculeux réséqués. *Indian Journal Med. Res.*, 1960, t. 48, 263-275.
7. BECK (F.). — Infection par bacilles tuberculeux résistants aux antibiotiques. *Am. Rev. Tub.*, 1956, t. 72, 1951.
8. BERGE (S.J.). — Comparaison du milieu de Loewenstein-Jensen et d'un milieu acide-oléique-albumine modifié pour la croissance du bacille de Koch. *Am. Rev. Tub.*, 1960, t. 81, 595.
9. BERTHELOT (A.). — *Bulletin de la Société de Chim. Biologique*, 1934, t. 16, 1553.
10. BERTOCCHIO (G.). — Contribution à l'étude du milieu de Tarshis pour la culture du bacille tuberculeux. *Thèse Marseille*, 1957.
11. BOUQUIN (Ph.). — Contribution à l'étude de la bacillémie tuberculeuse par la méthode de Loewenstein. *Thèse Lyon*, 1935.
12. BRUAN (H.) et GUNDACKER (W.). — Über die Züchtung von Tuberkelbakterien auf blutnährboden. *Z. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1959, t. 174, 424-430.
13. CASSAGNE (H.). — Milieux de culture. Editions de la Tourelle. Collection technique de base. Tome II, p. 248-250.

14. CHAVES (A.D.). — Prédominance de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes aux médicaments, isolées à partir de malades non traités dans la ville de New-York en 1960. *Am. Rev. Tub.*, 1961, t. 84, 647.
15. CHAVES (A.D.). — Prédominance de souches de *Mycobacterium tuberculosis* streptomycino et isoniazido-résistantes chez les malades atteints de tuberculose pulmonaire active, récemment découverte et non traitée. *Am. Rev. Tub.*, 1955, t. 72, 143.
16. CHODKOWSKI (A.). — L'utilité du milieu de Stonebrink pour l'isolement du bacille tuberculeux à partir d'un matériel contaminé. *Med. dos. Mikrobiol.* 1960, t. 12, 163-166.
17. COHN (M.L.), KOVITZ (C.), ODA (U.), MIDDLEBROOK (G.). — Etude sur l'isoniazide et le bacille tuberculeux.
I. — L'isolement des mutants résistants in vitro. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 70, 465-475.
II. — Les facteurs de croissance, l'activité catalasique et les propriétés pathogènes des mutants isoniazido-résistants. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 70, 641-664.
18. COLEMAN (C.M.). — Etude de quelques composés sulphydryl sur la croissance de bacilles tuberculeux catalase positifs et catalase négatifs. *Am. Rev. Tub.*, 1956, t. 74, 42.
19. COLETSOS (J.P.). — Milieux de culture du *Mycobacterium tuberculosis* de vitalité et de viabilité réduites. *C.R. des séances de l'Académie des Sciences*, 15 juin 1959, t. 248, 3497.
20. COLETSOS (J.P.). — Etude des facteurs extrinsèques de *Mycobacterium tuberculosis* rendant aléatoire sa culture in vitro. *Ann. Inst. Past.*, 1959, t. 97, 135.
21. COLETSOS (J.P.). — Etude des facteurs intrinsèques de *Mycobacterium tuberculosis* expliquant l'état de quiescence et les échecs de culture sur milieux usuels. *Ann. Inst. Past.*, 1959, t. 97, 290.
22. COLETSOS (J.P.). — La culture des mycobactéries dysgoniques en état de quiescence (bacilles dits visibles et non viables). *Presse Médicale*, n° du 26 oct. 1962.
23. DARZINS (E.). — Action des acides nucléiques et des phytohormones sur la croissance et la viabilité des mycobactéries. *Am. Rev. Tub.*, 1961, t. 84, 549.
24. DAVID (H.L.), CARDOSO (A.) et ALENQUER (M.). — Le milieu de Loewenstein-Jensen pour l'isolement de *Mycobacterium tuberculosis* résistant à l'I.N.H. *C.R. Soc. Biol. Paris*, 1960, t. 154, 22-225.
25. DOTTORI (B.). — Contribution à l'étude des méthodes d'isolement des mycobactéries à partir des produits pathologiques par l'emploi des différents sels d'ammonium quaternaire. *Thèse Lyon*, 1961.

26. DREA (W.F.). — Croissance du bacille de Koch en milieu profond. I. - Technique. II. - Etude de diverses techniques et aspects théoriques. *Am. Rev. Tub.*, 1946, t. 53, 353.
27. DUBOS (R.J.) et MIDDLEBROOK (G.). -- Milieux pour le bacille tuberculeux. *Am. Rev. Tub.*, 1947, t. 56, 334-345.
28. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*. Tuberculose - Syphilis - Cancer. Méthodes de diagnostic biologique de la tuberculose. 3309 A 10.
29. FABRE (A.). — Contribution à l'étude bactériologique de la tuberculose pulmonaire de l'enfant envisagée à ses différents stades. *Thèse Lyon*, 1935.
30. FINLAYSON (M.K.). — Effets des lipides du jaune d'œuf sur le développement du bacille tuberculeux. *New Zeal. J. Sci. Technol. B.*, 1951, t. 33, 230.
31. FISHER (M.W.). — Revival of tubercle bacilli after prolonged in vivo exposure to isoniazid. *Pr. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, t. 85, 538-546.
32. GAIND (K.N.). -- Milieu à l'acide élaïdique pour la culture du bacille tuberculeux humain. *Indian J. Med. Res.*, 1960, t. 48, 121-126.
33. GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Etude de l'activité catalasique des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide. *Rev. Tub.*, 1955, t. 19, 1.
34. GERNEZ-RIEUX (Ch.), GÉRARD (A.) et TACQUET (A.). — Essais de milieux spéciaux pour la culture des mycobactéries tuberculeuses résistantes à l'isoniazide. *Ann. Inst. Past. Lille*, 1956, t. 8, 53-72.
35. GRAY (D.F.), CLARKE (B.L.), JOHNSTONE (W.E.). — La découverte d'un petit nombre de bacilles tuberculeux en diagnostic. L'action létale des agents d'homogénéisation. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 69, 991-1001.
36. GRIEP (W.A.). -- L'influence d'un traitement chimio-antibiotique sur l'aptitude à la culture du bacille de la tuberculose. *Acta Tuberc. Scand.*, 1956, t. 32, 6.
37. HALPERN (B.) et KIRCHEIMER (W.F.). — Etude sur la croissance des mycobactéries. Effets de l'oxygénation et de l'aération sur les modalités de croissance des mycobactéries. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 70, 665-671.
38. HAWKINS (J.E.). — L'effet de la filtration sur les produits biologiques. Influence sur l'activité catalasique et lipasique. *Am. Rev. Tub.*, 1961, t. 84, 850.
39. HIRSCH (G.H.). — Milieu au charbon pour la culture du bacille de Koch. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 70, 955-976.

40. HIRSCH (G.H.). — Recherche sur les facteurs de croissance du jaune d'œuf agissant sur le bacille tuberculeux. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 70, 998.
41. HONDA (A.). — Quelques expérimentations sur la détection du bacille tuberculeux à partir de liquide de lavage gastrique et de crachats. Influence des conditions de conservation. *Kekkaku*, 1959, t. 34, 741-742.
42. IWASE (K.). — Transition in smear-positive-culture-negative instances and resistance of tubercle bacilli to drugs in sputum examination. *Kekkaku*, 1961, t. 36, 120.
43. KADOYA (K.). — La signification clinique de la méthode par examen direct après concentration pour la détection du bacille tuberculeux à l'ère de la chimiothérapie. II. - Détection du bacille de Koch à partir des crachats par la méthode de l'étalement simple, de l'étalement après concentration et de la culture, et ses relations avec l'aspect clinique du malade. *Kekkaku*, 1958, t. 33, 852.
44. KADOYA (K.). — La signification clinique de la méthode par examen direct après concentration pour la détection du bacille tuberculeux à l'ère de la chimiothérapie. I. - Détection du bacille tuberculeux par la méthode de Tamura. Etalement après concentration. *Kekkaku*, Ibid.
45. KAPLAN (M.), GRUMBACH (R.), DOBROWOLSKI (B.). — Contrôle indirect de la contagiosité des tuberculeux pulmonaires traités par l'isoniazide par l'étude des modes de contamination dans la tuberculose initiale de l'enfant. *Presse Médicale*, 1956, t. 64, 1809-1812.
46. KENNEY (M.). — Etude comparative de trois milieux à l'œuf pour l'isolement du *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Tub.*, 1954, t. 72, 863.
47. KNOX (R.). — Relation entre l'activité de la catalase, la sensibilité au peroxyde d'hydrogène et l'isoniazido-résistance des mycobactéries. *Am. Rev. Tub.*, 1956, t. 73, 726.
48. KREBS (A.). — Effet de la glycérine sur les bacilles de Koch résistants à l'I.N.H. *Klin. Woehr.*, 15 août 1956.
49. KULEJEWSKA (M.). — Comparaison entre le milieu lyophilisé de Sula et le milieu de Loewenstein-Jensen. *Gruzlica*, 1959, t. 27, 161-163.
50. KUMAGAI. — Etude pathologique et bactériologique sur les pièces d'exérèse pour tuberculose pulmonaire. *Kekkaku*, 1958, t. 33, 131.
51. LANGEROVA (M.). — Comparaison des œufs frais et des œufs conservés au froid pour la préparation des milieux pour le bacille tuberculeux. *Rozhledy V Tuberk.*, 1960, t. 20, 92-95.

52. LEMOINE (M.). — Les milieux et les techniques de Loewenstein de 1931 à 1933. Leur intérêt clinique et bactériologique dans la tuberculose. *Thèse Lyon*, 1933.
53. LESSLIE (E.W.). — Une comparaison entre quelques méthodes pour l'isolement de *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Comp. Path.*, 1959, t. 69, 1-10.
54. LITTLE (L.A.). — L'effet de la centrifugation sur la culture du bacille tuberculeux à partir des crachats. *Monthly Bull. Minist. Hlth* (London), 1958, t. 17, 239-241.
55. LYON (R.A.). — Facteurs affectant le développement du *Mycobacterium tuberculosis* dans les cultures aérobies et les cultures stagnantes. *Am. Rev. Tub.*, 1961, t. 83, 255.
56. MANKIEWICZ (E.). — Nouvelles techniques rapides pour la culture du *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Environment Health U.S.A.* 1962, 588-590.
57. MEISSNER (G.). — Kulturversager und I.N.H. therapie. *Zeitschr. Hyg. Infekt. Krankh.*, 1954, t. 139, 489-497.
58. MELNOTTE (P.), SENAERT (R.), HUTTIN (R.). — Méningite tuberculeuse rapidement mortelle à bacilles tuberculeux d'emblée résistants à la streptomycine et à l'isoniazide. *Rev. Med. Nancy*, 1956, t. 81, 27-30.
59. MIDDLEBROOK (G.) et COHN (M.L.). — Etude de l'activité catalasique des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide. *Science*, 1953, t. 118, 297.
60. MIDDLEBROOK (G.), COHN (M.L.) et SHAEFFER (W.B.). — Etude sur l'I.N.H. et le bacille tuberculeux. III. - Isolement, mesures de sensibilité à la drogue et application du test de l'activité catalasique des bacilles tuberculeux isolés de malades traités à l'I.N.H. *Am. Rev. Tub.*, 1953, t. 70, 854.
61. MIDDLEBROOK (G.). — Facteurs de croissance des bacilles tuberculeux résistants. *Am. Rev. Tub.*, 1957, t. 1, 155-156.
62. MILDRED (B.) et JEFFERIES. — Efficacité comparés des milieux de culture pour l'isolement de *Mycobacterium tuberculosis* à partir du matériel clinique. *Am. Rev. Tub.*, 1960, t. 81, 259.
63. MINAMI (K.). — Etude sur la croissance et la respiration des bacilles tuberculeux. *Fukushima J. Med. Sci.*, 1955, t. 2, 99.
64. MITCHISON (D.A.). — Milieux de culture pour le bacille tuberculeux durant la chimiothérapie par l'isoniazide. *Tubercle*, 1954, t. 35, 170-172.
65. MULLER (G.). — L'influence des combinaisons de substrats sur la croissance des mycobactéries (*M. phlei*). I. - Recherche comparative de l'action de chacune des composantes sur les bacilles I.N.H. sensibles et résistants. *Arch. Mikrob.*, 1960, t. 35, 361-366.

66. NISHIMURA (H.). — Le comportement du bacille tuberculeux dans les crachats spécialement dans les cas « d'examen direct positif culture négative ». III. - L'influence des substances antituberculeuses contenues dans les crachats sur la culture du bacille tuberculeux. *Kekkaku*, 1958, t. 33, 129-130.
67. NORMAN (J.O.). — Stimulation de la croissance des mycobactéries par le coenzyme Q 10. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1960, t. 2, 372-376.
68. NORMAN (J.O.). — Utilisation du dialysat de jaune d'œuf pour la croissance du bacille tuberculeux. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1960, t. 81, 423-425.
69. NUMATA (I.) et SAKATA (Y.). — Signification clinique des crachats montrant du bacille tuberculeux à l'examen direct et pas à la culture. *Kekkaku*, 1958, t. 33, 781.
70. OGAWA (T.). — Un milieu « à deux couches » pour la culture du bacille tuberculeux.
I. - Expérience pour établir le milieu. *Kekkaku*, 1960, t. 35, 218.
II. - Une expérimentation avec souches conservées et crachats. *Kekkaku*, 1960, t. 35, 298-299.
III. - Analyse de la composition du milieu à deux couches. *Ibid.*
71. OHSATO (T.). — Quelques observations sur l'incidence des bacilles tuberculeux résistants chez les tuberculeux pulmonaires non traités. *Kekkaku*, 1959, t. 34, 742-743.
72. PATTERSON (D.S.P.). — L'effet des oligo-éléments sur la croissance et le métabolisme du *Mycobacterium tuberculosis* variété avium. *Tubercle* (London), 1960, t. 41, 191-202.
73. PEIZER (L.R.). — A semi-synthetic medium for a routine tuberculosis laboratory. *Am. Rev. Tub.*, 1958, t. 78, 788.
74. PEIZER (L.R.). — Caractéristiques des populations de mycobactéries trouvées dans les crachats de tuberculeux après traitement prolongé par l'isoniazide. *Am. Rev. Tub.*, 1960, t. 82, 568.
75. RAMAKISHMAN (T.). — Nouveaux facteurs de croissance pour *mycobacterium tuberculosis*. *Nature* (G.B.), 1957, t. 179, 1356.
76. ROCHER (G.) et VIALIER (J.). — Etude de la sensibilité comparés pour la recherche du bacille de Koch, de la culture après traitement du prélèvement au Teepol et de l'inoculation au cobaye. *Ann. Biol. Clin.*, 1960, t. 18, 385-391.
77. ROSS (H.M.). — Etude comparée du milieu de Dubos et du milieu de Loewenstein pour le diagnostic de la tuberculose au Canada. *J. Med. Technol.*, 1952, t. 14, 60.
78. RUSIN (A.). — Résultats de l'examen bactériologique de pièces d'exérèse pulmonaire. *Gruzlica Tuberc.*, 1961, t. 29, 621-626.

79. RUTH (M.) et VAN LIEW. — Observations sur l'activité de la catalase du bacille de Koch. *Am. Rev. Tub.*, 1957, t. 76, 1007.
80. SAENZ. — Valeur diagnostique de la méthode de Loewenstein. *C.R. de la Soc. Biol.*, t. 107, 1453-1457.
81. SHEPARD (C.C.). — Etude de la croissance dans les cellules HeLa de bacille de Koch humain provenant de crachats. *Am. Rev. Tub.*, 1958, t. 77, 423.
82. TACQUET (A.). — Rapport entre le délai d'apparition des cultures sur milieu à l'œuf et la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux substances antibacillaires. *Ann. Inst. Pasteur de Lille*, 1957, t. 9, 38-47.
83. TACQUET (A.) et TISON (F.). — Isolement du bacille tuberculeux de 55.000 échantillons de crachats au moyen du Teepol 410 basique. Influence du milieu de culture. *Ann. Inst. Past. de Lille*, 1961, 153-158.
84. THIBIER (R.), CANETTI (G.) et LEPEUPLE (A.). — Tuberculose pulmonaire à bacilles résistants chez les malades non encore traités. *Rev. Tub. Paris*, 1960, t. 24, 831-868.
85. TIRUNARAYANAN (M.O.) et VISCHER (W.A.). — Rapports entre l'I.N.H. et le métabolisme des mycobactéries. Catalase et peroxydase. *Am. Rev. Tub.*, 1957, t. 75, 62.
86. TOMODA (T.). — Etude sur la peroxydase de *Mycobacterium tuberculosis*. I. *Kekkaku*, 1958, t. 33, 705.
87. TOMODA (T.). — Etude sur la peroxydase de *Mycobacterium tuberculosis*. II. *Ibid*, p. 855.
88. TOYOHARA (M.). — Activité catalasique de souches I.N.H. - résistantes. II. - L'activité catalasique de souches I.N.H. - résistantes isolées des crachats. *Kekkaku*, 1957, t. 32, 710.
89. VEAUX (R.). — Application de l'œuf incubé à la culture du bacille de Koch. *Thèse Bordeaux*, 1958.
90. VIALIER (J.) et CAYRE (R.M.). — Activité catalasique et sensibilité à l'I.N.H. des mycobactéries pathogènes. *Ann. Inst. Past.*, 1956, t. 90, 373-374.
91. VIALIER (J.) et CAYRE (R.M.). — Difficultés actuelles de l'identification des mycobactéries. *C.R. de la Soc. Biol. de Paris*, 1958, t. 152, 109-112.
92. VIALIER (J.), OLLAGNIER (C.) et PERRIN (L.F.). — Evolution clinique des tuberculoses pulmonaires à bacilles isoniazido-résistants. *Rev. Lyonn. de Med.*, 1958, t. 7, 1153-1159.

- 93 VIALIER (J.), CAYRE (R.M.) et AUGAGNEUR (J.). — Isolement des mycobactéries par culture des produits souillés. Nouvelle technique de traitement par les ammoniums quaternaires. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 1961, t. 155, 793-794.
94. WOLINSKY (E.). — Sensibilité à l'INH, activité catalasique et virulence pour le cobaye de cultures récemment isolées de *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Tub.*, 1956, t. 73, 768.
95. YOUNG (G.P.) et YOUNG (A.S.). — Effets des glucides et des alcools sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*. *Journ. Bact. U.S.A.*, 1953, t. 65, 92.
96. YOUNG (G.P.) et YOUNG (A.S.). — Effets des composés appartenant au cycle de l'acide tricarboxylique sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*. *Ibid.*, p. 96.
97. YOUNG (G.P.) et YOUNG (A.S.). — Croissance de *Mycobacterium tuberculosis* variété *hominis* en présence des différents intermédiaires de la transformation du glucose en acide pyruvique. *Ibid.*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
CHAPITRE PREMIER. — Méthodes et milieux proposés pour l'isolement du bacille tuberculeux à partir des produits pathologiques	15
CHAPITRE II. — Valeur comparée des différents milieux et méthodes de culture pour l'isolement du bacille de Koch à partir des produits pathologiques	19
CHAPITRE III. — Analyse des facteurs intervenant dans la valeur des méthodes de culture du bacille de Koch	21
1) Facteurs tenant au milieu de culture	21
2) Facteurs tenant à la méthode de traitement	24
CHAPITRE IV. — Problèmes posés par la culture des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide	27
CHAPITRE V. — Méthodes et milieux de Coletsos pour l'isolement du bacille tuberculeux à partir des produits pathologiques	33
CHAPITRE VI. — Etude des résultats obtenus par l'utilisation systématique des milieux de Coletsos	37
1) Recherche de mycobactéries tuberculeuses ou non tuberculeuses dans les viscères de souris inoculées avec ces mycobactéries	38
2) Utilisation systématique du milieu Coletsos-base pour la mise en évidence du bacille tuberculeux dans les produits pathologiques humains	45
3) Utilisation systématique des milieux Coletsos-base et Coletsos-base-osséine pour la mise en évidence de bacilles tuberculeux réputés non cultivables dans les produits pathologiques humains	50
CONCLUSIONS	53
BIBLIOGRAPHIE	55

